

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

**Srovnání metod RFLP, RAPD, SSR
a AFLP použitých při studiu genomu
Prunus persica (L.)**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Jana Raddová, Ph.D.

Vypracovala:

Martina Vlašínová

Lednice 2015



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Martina Vlašínová**

Studijní program: Zahradnické technologie

Obor: Zahradnictví

Název tématu: **Srovnání metod RFLP, RAPD, SSR a AFLP používaných při studiu genomu *Prunus persica*(L.)**

Rozsah práce: 30

Zásady pro vypracování:

1. Při zpracování tématu bude třeba prostudovat literaturu týkající se molekulárních metod při analýzách rostlinné DNA (včetně izolací rostlinné DNA).
2. V práci bude třeba vypracovat přehled poznatků o metodách RFLP, RAPD, SSR a AFLP a dále jejich použití při studiu genomu *Prunus persica*(L.) U každé metody je třeba posoudit její klady a zápory z hlediska pracnosti, časové náročnosti a z hlediska získaných výsledků a jejich aplikace při poznání genomu druhu *Prunus persica* (L.)
3. V závěru práce bude srovnání metod RFLP, RAPD, SSR a AFLP a jejich využití při studiu genomu druhu *Prunus persica* (L.).



Seznam odborné literatury:

1. Aranzana MJ, Arús P, Carbó J, King GJ (2001) AFLP and SSR markers for genetic diversity analysis and cultivar identification in peach [Prunus persica (L.) Batsch.] Acta Hort.546: 367-370
2. Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbó J, Arús P (2002) Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. Plant Breeding 121(1): 87-92
3. Cipriani G, Lot G, Huang WG et al. (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [Prunus persica (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in Prunus. Theor. Appl. Genet 99: 65-72
4. Guilleumaut P, Maréchal-Drouard L (1992) Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. Plant Mol. Biol. Rep 10: 60-65
5. Powell W, Morgante M, Andre C. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breeding 2: 225-238

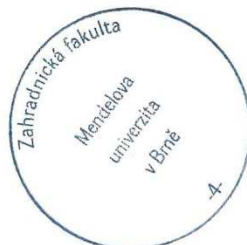
Datum zadání bakalářské práce: prosinec 2013

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2015

L. S.



Martina Vlašínová
Autorka práce



Mgr. Jana Raddová, Ph.D.
Vedoucí práce



Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci:

„Srovnání metod RFLP, RAPD, SSR a AFLP použitých při studiu genomu *Prunus persica* (L.)“

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Janě Raddové, Ph.D. za trpělivost, porozumění a pomoc v průběhu psaní mé bakalářské práce a také mé rodině a přátelům za jejich pomoc a podporu.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce.....	10
3. Broskvoně	11
3.1 Původ broskvoní.....	11
3.2 Zařazení broskvoní do botanického systému a klasifikace odrůd.....	11
3.3 Morfologická charakteristika orgánů broskvoně	12
3.4 Genetická charakteristika broskvoně	14
3.5 Historie pěstování broskvoní.....	14
4. Šlechtění broskvoní.....	15
5. Izolace DNA	16
6. Molekulární metody.....	17
6.1. Metoda RFLP	18
6.2. Metoda PCR	19
6.3 Genetické markery	20
6.4. Metoda RAPD	21
6.5 Metoda AFLP	23
6.6 Metoda SSR	26
7. Diagnostika patogenů u broskvoní	28
7.1 Houbové choroby	28
7.2 Bakteriální onemocnění	30
7.3 Virové choroby.....	31
7.4 Fytoplazmy.....	32
7.5 PTSL	33
8. Fingerprinting	34
9. Transpozóny ISSR	35
10. Mapování DNA.....	36

11. Vlastní komentář k řešené problematice.....	37
12. Závěr	39
13. Souhrn.....	40
Summary	41
14. Použitá literatura	42

Seznam tabulek:

Tabulka 1 Příklad složení mastermixu pro RAPD reakci.....	22
Tabulka 2 Příklad složení mastermixu pro SSR reakci	27
Tabulka 3 Nejvýraznější výhody a nevýhody jednotlivých molekulárně genetických technik.....	37

1. Úvod

Broskvoně jsou významným hospodářským druhem. Jsou oblíbenou a intenzivně pěstovanou kulturou.

V současné době moderní šlechtitelské programy pro rod *Prunus* jsou zaměřeny jak na preference spotřebitelů, tak i pěstitele. Spotřebitelské preference se týkají především kvality ovoce, proto se šlechtitelské programy zaměřují na získání plodů, které mají přijatelnou chuť a žádoucí strukturu. Na druhou stranu, pěstitelé vyžadují vysoce produktivní kultivary, tzn. odolnost proti chorobám a škůdcům, prodloužení doby sklizně i produkci ovoce a zvýšení možnosti doby skladovatelnosti.

Mladým stromkům broskvoní trvá 1-2 roky než začnou utvářet své první květy. Délka juvenilní fáze nepochybně ovlivňuje šlechtitelský cyklus, a to zejména vyhodnocení ovoce, výběr těch nejlepších hybridů a zejména kultivarů. Na rozdíl od morfologického posouzení je možné prostřednictvím molekulárních metod zjistit tyto informace mnohem dříve.

Mezi tyto molekulární metody patří např. metody RFLP, RAPD, SSR a AFLP. Všechny tyto metody se zabývají zjišťováním genetických rozdílů mezi jedinci jednoho druhu. Jsou široce využívány pro analýzu genetické variability, identifikace kultivarů, fingerprinting a tvorbu genetických map.

Všechny tyto metody při studiu broskvoní slouží pro objasnění genetické variability a jejich využití pro vyšlechtění nových, kvalitnějších a odolnějších kultivarů.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo vypracovat přehled poznatků o metodách RFLP, RAPD, SSR a AFLP a dále jejich použití při studiu genomu *Prunus persica* (L.) U každé metody byly posouzeny její klady a zápory z hlediska pracnosti, časové náročnosti a z hlediska získaných výsledků a jejich aplikace při poznání genomu druhu *Prunus persica* (L.)

V práci bylo třeba prostudovat literaturu týkající se molekulárních metod při analýzách rostlinné DNA (včetně izolací rostlinné DNA).

V závěru práce byly srovnány metody RFLP, RAPD, SSR a AFLP a jejich využití při studiu genomu druhu *Prunus persica* (L.).

3. Broskvoně

3.1 Původ broskvoní

Pojmenování broskvoní - *Prunus persica* (L.) je odvozeno od názvu Persie (dnešní Irán).

V průběhu staletí se mnoho vědců pokoušelo o klasifikaci druhů broskvoní. Jejich spisy poukazují, že broskvoň a mandloň pokládali za stejný druh, jelikož byli v domnění, že sdílí stejného předchůdce (Layne and Bassi, 2008).

V této práci je použit název pro broskvoň *Prunus persica* (L.).

3.2 Zařazení broskvoní do botanického systému a klasifikace odrůd

Broskvoň je samostatným rodem v čeledi *Rosaceae*. U nás pěstovaná *Prunus persica* (L.) se dělí na:

P.p.subsp. vulgari – broskve obyčejné,

P.p. subsp. laevis – nektarinky,

P.p. subsp. platycarpa – broskve ploché (Bažant *et al.*, 2003).

Dle odrůd se broskvoně člení na 4 skupiny:

1. pravé broskve (plstnatá slupka, dužnina odlučitelná od pecky),
2. tvrdky (plstnatá slupka, dužnina neodlučitelná od pecky),
3. nektarinky (lysá slupka, dužnina odlučitelná od pecky),
4. bryňonky (lysá slupka, dužnina neodlučitelná od pecky) (Bažant *et al.*, 2003).

Podle místa vzniku a rozšíření se zařazují do 4 skupin:

1. Ferganská skupina. *Persica ferganensis* se u nás nepěstuje.
2. Severočínská skupina. Odrůdy s růžovitým typem květů. Dominují vysokou mrazuvzdorností s dlouhou dormancí.
3. Jihočínská skupina. Vyznačují se krátkým obdobím vegetačního klidu a brzkým nástupem vegetace, hodí se do subtropických oblastí.
4. Íránská skupina. Odrůdy se žlutou dužninou a zvonkovitým typem květů. Do této skupiny patří nejvíce odrůd z Ameriky a Evropy (Bažant *et al.*, 2003).

Zařadit dnešní odrůdy do výše uvedeného členění je někdy problematické. Většina nových odrůd totiž vznikla šlechtěním.

V pěstitelské i obchodní sféře je členění odrůd na broskve pravé, nektarinky a tvrdky. Nektarinky a většina broskví se považují za konzumní ovoce, tvrdky za ovoce konzervářské (Bažant *et al.*, 2003).

3.3 Morfologická charakteristika orgánů broskvoně

Struktura koruny a kořenové soustavy broskvoní pěstovaných v zahradách se odlišuje od stromů volně rostoucích. Vytváření orgánů pěstovaných broskvoní je způsobeno především přesazováním podnoží ze semeniště do školky a na stálé stanoviště, tvarováním koruny, řezem a ostatním agrotechnickým opatřením.

- Kořenový systém

Kořenový systém je utvořen, tzv. kůlovým kořenem, bočními kořeny a kořenovým vlášením.

Kořeny rostou ve dvou etapách. První probíhá na jaře, kdy teplota půdy získá teplotu 7 až 8 °C (květen až červen), a druhá se odehraje na podzim při poklesu půdní teploty na 4 až 2 °C.

Podnožové druhy se velice liší v mohutnosti a hloubce kořenového systému, ovšem i v nástupu jarní a ukončení podzimní etapy růstu kořenů.

- Kořenový krček

Nazýváme tak místo přechodu mezi podzemní a nadzemní částí, kde přechází kořenové radiální svazky cévní na kolaterální svazky kmene a větví.

- Kmen a větve

Ve školce probíhá zapěstování na nízkokmen s výškou kmene 60 až 90 cm.

U prostorových korun se provede rozštěpení kmene na několik kosterních větví I. řádu a na větve II. a dalších řádů tzv. polokosterní větve.

Jednoleté výhony tvoří podstatu pro dobrou plodnost broskvoní, proto je u větví II. až III. řádů každoročním řezem podporována tvorba letorostů.

Během vývoje broskvoní je jejich intenzita růstu postupně oslabena. Na mladých stromech se utváří bujné růstové výhony, ze kterých je postavena kostra koruny. Stromům v období plodnosti se navyšuje počet nerozvětvených výhonů s vegetativními a generativními pupeny. Síla růstu letorostů v jednotlivých vývojových fázích stromů je způsobena výživou, závlahou, podnoží a zejména řezem v plné plodnosti.

- Listy

Forma listu je kopinatá a velikost závisí na odrůdě a rovněž na pozici v koruně. Barvu listů můžeme odhadnout podle odrůd, kdy např. odrůda 'Luna' má listy světle zelené se stříbrným odstínem, na odrůdě 'Dixired' najdeme sytě zelené listy a odrůda 'Redhaven' zahrnuje zelené listy s oranžovým odstínem. Okraje listů má broskvoň zubaté až pilovité. Jedním z identifikačních rysů odrůdy jsou žlázy na řapících. Jejich tvar je kulatý nebo ledvinovitý, na některých odrůdách se objevují kombinace obou tvarů a na dalších žlázy zcela chybí.

- Květové (květní) a listové pupeny

Květové (generativní) pupeny se utváří pouze na jednoletých výhonech. Tvar listových pupenů je špičatý, kdežto pupeny květové mají tvar zaoblený. Z listových pupenů vyrostou listové růžice a letorosty, plody se utvoří po oplození z pupenů květových.

- Květy

Odrůdy broskvoní se rozdělují podle tvaru květu na růžokvěté (zvonkovité) a zvonkokvěté. Korunní plátky růžovitých květů jsou zbarveny od bílé přes světle růžovou až po sytě růžovou. Odstín zbarvení určuje daný rys odrůdy. Zvonkovité květy bývají menší a jejich korunní plátky mají růžové zbarvení s odstíny.

V ČR se pěstují broskvoně samosprašné a hmyzosnubné.

- Plody

Plod tvoří peckovice. Členění broskvoňových odrůd je určováno podle charakteristiky plodů. U ranějších odrůd bývají plody povětšinou drobnější, mají okolo 50 až 80 g, u odrůd středně a pozdě zrající kolem 150 až 200 g. Procento zastoupení dužniny na hmotnosti plodů je přibližně 90 %. Obsah sušiny se pohybuje v okruhu od 9 do 22 %, kdy záleží na odrůdě a pěstitelském prostředí. Tomu odpovídá i obsah vody, který se pohybuje od 91 do 78 %. Podíl cukrů v sušině tvoří 5,7 až 14,9 %, kyseliny chiniová, jablečná a citronová 0,2 až 0,8 %, sůl 0,3 až 0,8 % a pektiny 0,5 až 0,9 %. Z cukrů je hlavní představitelem sacharóza, představující 2,8 až 10,0 %, obsah glukózy a fruktózy je značně nižší (Bažant *et al.*, 2003).

3.4 Genetická charakteristika broskvoně

Mladým stromkům broskvoní trvá 1-2 roky než začnou utvářet své první květy. Délka juvenilní fáze nepochybně ovlivňuje šlechtitelský cyklus, a to zejména vyhodnocení ovoce, výběr těch nejlepších hybridů a zejména kultivarů. Na rozdíl od morfologického posouzení je možné prostřednictvím molekulárních metod zjistit tyto informace mnohem dříve.

Karyotyp byl u broskvoní studován během meiózy (Jelenkovic and Harrington, 1972) a mitózy (Salesses and Mouras, 1977). Je složen ze zřetelně identifikovatelného, velkého submetacentrického chromozomu a z dalších sedmi chromozomů o menší velikosti, kdy dva z nich jsou akrocentrické. Genom broskvoně je jedním z nejmenších mezi pěstovanými druhy, s odhadovanou délkou 290 Mbp (Baird *et al.*, 1994). Stejně jako u všech druhů *Prunus*, broskvoň, japonská švestka a třešeň mají základní počet chromozomů $x = 8$ a diploidní genom organizovaný v $2n = 2x = 16$ chromozomů (Monet a Bassai, 2008; Arus *et al.*, 2012).

Samosprášení (Miller *et al.*, 1989) má za následek nižší úroveň genetické variability broskvoní ve srovnání s ostatními plodinami z rodu *Prunus* (Byrne, 1990). Vysoký hospodářský zájem o broskvoně umožňuje vývoj F2 potomstva, které má za následek zkrácení juvenilního období o 1-2 roky po výsadbě broskvoní (Scorza and Sherman, 1996).

3.5 Historie pěstování broskvoní

Broskvoň (*Prunus persica* (L.)), která se pěstuje více než 4000 let, je vysoce geneticky charakterizovaná dřevina. Za místo původu broskvoní je považována severozápadní Čína, mezi horami Kunlun Shan a Tarim (Faust and Timon, 1995).

Ve staré čínské literatuře, která pochází z 3. tisíciletí př. n. l., se o broskvoních dočteme v knihách Š ting (Kniha písní) a Čehimin – jao – šu. V těchto spisech najdeme dva způsoby rozmnožování broskvoní, tj. semeny a roubováním. Zde popisovaný sortiment zahrnuje více než 30 kultivarů broskvoní. Pod názvem 'Maotao' byly známé divoce rostoucí pravé plstnaté broskvoně, 'Yitao' byly broskvoně divoké. Tyto kultivary se dochovaly i do dnešní doby, kdy se využívají jako podnože v odlehlých hůře přístupných oblastech Číny (Yuzhu, 2000).

V Čechách a na Moravě došlo k pěstování broskvoní za vlády Karla IV. (Blaha, 1966).

Počátkem 19. století se nejlepší broskvoně pěstovaly na jižní Moravě. Největší plochy pěstování broskvoní byly zaznamenány na území mezi Brnem a Břeclaví. V porovnání s dnešní kvalitou broskvoní, byla ta tehdejší na nízké úrovni a to především proto, že se tehdejší broskvoně pěstovaly nejčastěji ze semene – tzv. „vinohradnické semenáče“ (Oukropec, 2000).

4. Šlechtění broskvoní

Prvním významným šlechtitelem broskvoní byl Josef Eduard Proche (1822 – 1908). V této době vznikly semenáčky, které měly téměř uniformní vzhled s dobrou odolností vůči mrazu a půdním stresovým faktorům (Oukropec, 2000).

V současnosti je *Prunus persica* různorodý druh, který se používá pro výživu, ale i okrasné účely. Rozšíření spotřeby broskví závisí na jejich uvádění na trh, konzistentní kvalitě a náklady na ovoce. Zájmem pěstitelů v produkčních systémech je prodloužení sklizně, snížení chemických vstupů a zajištění kvality konzistence plodů. To vede k zaměření se na pěstování odrůd s vyšší kvalitou, vyšší odolností proti chorobám a škůdcům, větší rozmanitosti druhů na trhu a adaptace na subtropické a tropické oblasti světa (Byrne, 2002).

Broskvoň, stejně jako třešeň a švestka, jsou komerčně významné druhy *Prunus* (Okie and Weinberg, 1996; Scorza and Sherman, 1996, Sansavini *et al.*, 2006). Ačkoli tyto ovocné druhy byly kultivovány již před 2,000-4,000 lety, jejich šlechtění na nové kultivary se začalo rozvíjet za posledních 100 let (Okie and Hancock, 2008; Iezzoni, 2008). Podle Byrne (2005) bylo zatím vyšlechtěno asi 3000 kultivarů *Prunus*. V současné době moderní šlechtitelské programy pro broskvoně, třešně a japonské švestky jsou zaměřeny jak na preference spotřebitelů, tak i pěstitelů. Spotřebitelské preference se týkají především kvality ovoce, proto se šlechtitelské programy zaměřují na získání plodů, které mají přijatelnou chuť a žádoucí strukturu. Na druhou stranu, pěstitelé vyžadují vysoce produktivní kultivary, tzn. odolnost proti nemocem, prodloužení doby sklizně i produkci ovoce a zvýšení možnosti doby skladovatelnosti (Byrne, 2005).

Za strategické křížení, uplatňované při šlechtitelských programech, je považována hlavně hybridizace (intra a mezidruhová) a otevřené opylení. Broskvoň se snadno opyluje, protože je samosprašná (self-compatible) (Scorza and Sherman, 1996).

Dědičnost některých vlastností, např. chuti, textury, velikosti, tvaru, vnější barvy, pevnosti, trvanlivosti, výnosu, doby kvetení a sklizně, vykazala kvantitativní charakter dědičnosti, který souvisí s kvalitou ovoce a jeho produktivitou (Scorza a Sherman, 1996; Okie a Weinberg, 1996; Souza *et al.*, 1998; Fotric *et al.*, 2007; Hancock *et al.*, 2008; Okie and Hancock, 2008, Dirlewanger *et al.*, 2012).

Souhrn tradičních i moderních šlechtitelských metod používaných k vývoji nových odrůd *Prunus* je používán u broskvoní a dalších zástupců rodu *Prunus*. Používají se sazenice, včetně kultivačních nástrojů *in vitro*. Transkriptomika a genomické zdroje poskytují pochopení molekulárního základu fenotypové variability, jakož i určení alelických variant a molekulárních markerů. Ty zas slouží pro pochopení genetické rozmanitosti druhů *Prunus*, je využívána markery asistovaná selekce (MAS - marker-assisted selection) a transgenoze. Molekulární markery RAPD, SSR, AFLP a jednonukleotidový polymorfismus (SNP) jsou známé jako užitečné nástroje k popisu genetické variability u broskvoní a dalších zástupců rodu *Prunus*.

5. Izolace DNA

Izolace DNA je běžný postup k získávání DNA pro následné molekulární analýzy. Extrahovaná genomová DNA z rostlinného materiálu obsahuje jadernou, mitochondriální i chloroplastovou DNA. Veškerá takováto DNA slouží pro diagnostické a fylogenetické použití a umožňuje uplatnění polymerázové řetězové reakce (PCR) k získání specifické informace z DNA. Čistá DNA může být užita pro studium struktury DNA a jejího chemického složení, zkoumání přenosu informace z DNA do proteinů, provádění DNA hybridizace a pro klonování a sekvenování. Problémy extrakce DNA se mohou vyskytnout různé, pokud rostlinný materiál obsahuje vysoké množství polysacharidů a další sekundární metabolity, které mají vliv na čistotu DNA [Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*)].

Dnes existuje spousta způsobů jak izolovat DNA. Jedním z nich je izolace DNA založená na základě připravených roztoků, tzv. klasické postupy, kde jsou nejvíce využívány metody s cetyltrimethylammonium bromidem (CTAB) a NaCl anebo metoda izolace DNA podle Dellaporta *et al.* (1983).

Klasickou metodou izolace DNA je také metoda CTAB. Při izolaci DNA je potřeba rozbít buněčnou stěnu a plazmatickou membránu buněk. Při použití CTAB tvoří v pufru polysacharidy s DNA suspensi. Pevné částičky jsou odstraněny centrifugací, rozpustné složky, jako např. proteiny, jsou odstraněny rozpuštěním v chloroformu a centrifugací (Doyle and Doyle, 1987).

Dalším způsobem izolace DNA je v současnosti nejběžnější extrakce na pevné fázi za pomoci kitů, např. DNeasy Plant Mini kit (f. Qiagen) nebo Nucleospin Plant Kit (f. Clontech). Pevná fáze je umístěna uprostřed mikrozkušavky (tzv. kolona) v podobě membrány. Kolony obsahující modifikovanou membránu ze silikagelu pohlcují nukleové kyseliny za přítomnosti chaotropních solí. Ve vodě či roztocích s nízkou iontovou silou budou zachycené nukleové kyseliny z membrány uvolňovány.

Izolace DNA na bázi kolon je časově méně náročná, izoláty DNA je možno získat ze všech rostlinných druhů, pouze jsou zde vyšší náklady na jeden vzorek a na rozdíl od izolace na bázi vlastních roztoků se maximální výtěžek DNA výhradně pohybuje v jednotkách mikrogramů.

Kvalita a kvantita izolované DNA je kontrolována spektrofotometrickým měřením získaných roztoků DNA při $\lambda=260$ a 280 nm, dále fluorometrickým stanovením nebo elektroforézou na agarózovém gelu (Baránek *et al.*, 2006).

6. Molekulární metody

Následují po morfologických sledováních v sadech a studiu izoenzymových spekter. Pracují s informacemi na úrovni DNA, což může umožnit urychlení šlechtitelského procesu a studia odolností proti různým chorobám a vlivům vnějšího prostředí.

6.1. Metoda RFLP

Polymorfismus délky restričních fragmentů (z anglického „*Restriction Fragment Length Polymorphism*“) Vznikla v 80. letech jako první metoda založená na bázi DNA. Má celou řadu různých využití. Jednou z možností je identifikace genů zodpovědných za určitá onemocnění (Hostettmann, 2014). V nynější době je však méně užívanou metodou. Stala se základem pro genetické mapování lidského, eukaryotního a rostlinného genomu (Baránek *et al.*, 2006).

Principem této metody je použití restričních endonukleáz a hybridizace DNA. Všechny dané vzorky DNA jsou štěpeny stejnou restriční endonukleázou. Po provedení elektroforézy v agarózovém gelu se provede Southernův přenos na nitrocelulózový filtr. Dále se DNA hybridizuje s přijatelnou radioaktivně značenou molekulární DNA sondou. Polymorfismus hybridizujících fragmentů se kontroluje na autoradiogramech (Baránek *et al.*, 2006).

Za vznik bodových mutací mohou rozdílné polohy hybridizujících fragmentů (Baránek *et al.*, 2006).

Polymorfismus je spolehlivým znakem pro odlišení heterozygotů od obou typů homozygotů, jeho znaky jsou tedy kodominantní. Nevýhodou je však velká finanční náročnost, dále utvoření podmínek pro práci s radioaktivními prekurzory, ale i nezbytnost velkého množství vysoce čisté a nepoškozené genomické DNA (Baránek *et al.*, 2006).

Broskvoň (*Prunus persica* (L.) je považována za nejlépe geneticky charakterizovaný druh rodu *Prunus*. Proto byla použita jako modelový objekt při studiu uspořádání genomu *Prunus*, pomocí RFLP. První výsledky ukázaly, že se vyskytuje 60 % klonovaných sekvencí DNA, zkoumaných při nízkém počtu kopií v genomu broskvoně. Po výběru a zkoumání těchto sekvencí byly nalezeny polymorfismy dostatečné pro mapování RPLP. Bylo zjištěno, že mezi broskvoňovými kultivary bylo detekováno metodou RPLPs 33 % cDNA klonů a 20 % genomických klonů. Analýza segregace RPLP proběhla ve dvou kulturách, kde u obou došlo k oddělení známých morfologických znaků. V segregaci bylo odhaleno 12 RFLP markerů pro jednu kulturu a 16 na straně druhé. I když byla zjištěna vazba mezi RFLP a morfologickými markery, předběžné analýzy mohou naznačit souvislost mezi dvěma RPLP markery (Eldredge *et al.*, 1992).

6.2. Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (angl. PCR, *polymerase chain reaction*). Za její objev získal roku 1993 Kary Mullis Nobelovu cenu (Chloupek, 2000).

Metody postavené na polymerázové řetězové reakci jsou základem většiny molekulárních laboratoří. PCR je založena na enzymatické amplifikaci DNA *in vitro*. Od zavedení použití termostabilní DNA polymerázy v roce 1988 vzrostlo využití PCR v oblasti výzkumu i v klinických laboratořích a v současné době dokumentují o úspěchu této techniky desítky tisíc publikací. V typickém testu PCR je možno rozeznat tři kroky s řízenou teplotou, které se opakují v řadě 25 až 50 cyklů.

PCR je metoda, při které probíhá syntéza nukleových kyselin, kde jsou z původní templátové DNA replikovány její určité segmenty. Používají se dva primery (tzv. oligonukleotidy o známých sekvencích) ohraničující amplifikované DNA fragmenty. Dané primery hybridizují s určitými komplementárními místy, kdy během reakce dochází k množení sekvencí pouze mezi danými primery. Využívá se termostabilní DNA, která je izolována z termofilních bakterií a slouží k prodlužování primerů za vzniku nových řetězců (Baránek *et al.*, 2006).

Selektivita reakce je dána volbou primerů. Primery jsou jednovláknové DNA sekvence, komplementární k sekvenci matrice lemující cílové oblasti. Aby byla umožněna exponenciální amplifikace, musí primery nasedat v opačných směrech. Amplifikace je nejúčinnější, jestliže obě vazebná místa primerů nejsou od sebe dále než přibližně 4 kb (Weising *et al.*, 2005).

Pro správný průběh PCR je třeba, aby spolu reagovaly jednotlivé složky, ze kterých může vzniknout nové vlákno amplifikované (namnožené) DNA.

Reakční směs se skládá z:

1. pufru, obvykle obsahující HCl, KCl a MgCl₂,
2. termostabilní DNA-polymeráza, která přidává nukleotidy k 3'-konci primeru a nasedá k jednořetězcové DNA (ssDNA),
3. čtyř deoxyribonukleotidů fosfátů [dNTPs]: dATP, dTTP, dCTP, dGTP,
4. dvou oligonukleotidových primerů,
5. templátové DNA.

PCR probíhá v opakujících se cyklech, které probíhají ve třech stupních:

1. denaturační krok,
2. annealing, nasednutí primeru, hybridizace,
3. růst, prodlužování nového řetězce neboli extenze.

V prvním kroku prvního cyklu se z původní templátové DNA utvoří zvýšením teploty na přibližně 94°C dva samostatné řetězce DNA (tzv. denaturační krok). Ve druhém kroku se provede snížení teploty na 35 až 65°C (v závislosti na sekvenci primerů a experimentální strategii). Primery se hybridizují s komplementárními místy (tzv. annealing), které jsou identická nebo vysoce homologní s jejich nukleotidovými sekvencemi. Primery se vážou ve směru polymerázy DNA, tj. od 5' k 3' konci. Při třetím kroku se volí teplota, při které je aktivita termostabilní polymerázy optimální – obvykle 65 až 72°C. Polymerázy nyní rozšiřují 3'-konce DNA primerů hybridů směrem k vazebnému místu na druhém primeru. Vzhledem k tomu, že oba primery nasedají na oba řetězce DNA, je cílový fragment zcela replikován (tzv. růst nového řetězce).

Při opakování daného cyklu se dvě výsledné dvouvláknové DNA opět denaturují na původní vlákna.

Jedním z hlavních důvodů všestrannosti PCR metody je, že jakýkoliv druh primerů může být zvolen v závislosti na účelu studie (Weising *et al.*, 2005).

6.3 Genetické markery

Získávání informací o genetické variabilitě a struktuře u druhu *Prunus* může poskytnout užitečné genetické informace pro šlechtění nových kultivarů a pro další genetické výzkumy. V současné době, molekulární markery umožnily určení genetické variability pro volně se vyskytující a kulturní genotypy (Blenda *et al.*, 2007).

Mezi sadou vytvořených fragmentů se nachází i ty, které mohou být naamplifikované z jednoho genomového vzorku DNA. Z toho vyplývá, že pokud by se v genomové DNA vyskytovaly či nevyskytovaly fragmenty, budou stále v populaci organismů polymorfní. Proto se využívá u většiny organismů ke stanovení velkého množství RAPD genetických markerů, které následně slouží pro odlišné typy genetických a populačních studií (Hartl, 1988).

Pomocí PCR metod lze získávat informace v podobě genetických markerů. Genetický marker je DNA sekvence se známou pozicí na chromozomu a sdružená s jednotlivým znakem. Běžnými používanými typy genetických markerů jsou: polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), polymorfismus náhodně amplifikované DNA (RAPD) a jednoduchá opakující se sekvence (SSR).

Mohou být dále tříděny na dominantní nebo kodominantní. Dominantní markery umožňují analýzu mnoha míst na řetězci DNA najednou, patří sem RAPD a AFLP metoda (Shaw *et al.*, 2009).

6.4. Metoda RAPD

Byla popsána v roce 1990 a její úplný název zní: Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů DNA (z anglického „*Random Amplified Polymorphic DNA*“). Metoda RAPD je typ PCR reakce s rozdílem, že je zde použit jen jeden primer, u kterého není potřeba znát konkrétní sekvence cílových oblastí DNA. Nezbytné je však, aby obsah GC (podíl guanino-cytosinového komplementárního páru) ve struktuře DNA tvořil minimálně 40 %. Při aplikaci krátkých primerů je potřeba použít nižší teploty hybridizace, kolem 36°C (Baránek *et al.*, 2006). Jelikož jsou využity krátké primery o délce kolem 10 nukleotidů, mají schopnost se na více místech navázat na templátovou DNA (Hartl, 1988).

Úspěšnost metody RAPD závisí na koncentraci DNA, počtu cyklů v termocykleru, kvalitě a koncentraci použitých primerů, koncentraci hořčíku, zvolené DNA polymeráze, ale i na přesnosti pipetování (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997). RAPD reakce jsou velmi citlivé na teplotní profil v termocykleru, jelikož se změnou teploty může zřetelně změnit i výsledná forma RAPD produktů. Kritická teplota nehrozí při denaturaci templátové DNA, ale při hybridizaci primerů s komplementárními místy v templátové DNA, kdy nejvhodnější teplota je 36°C (Baránek *et al.*, 2006). Denaturace templátové DNA probíhá při 90-95°C a prodlužovací fáze při 72°C. Primer hybridizuje na určitých místech řetězce DNA, kdy po syntéze nových řetězců vznikne směs mnoha fragmentů o rozličné délce. Jejich polohu můžeme zviditelnit pomocí fluorescenčního barviva převedením na agarózový gel. Vše probíhá po vykonání elektroforézy, která probíhá v prostředí stejnosměrného elektrického proudu a při které dochází podle hmotnosti k přerozdělení fragmentů DNA.

Závěrem dostaneme v RAPD profilu až 15 diskretních produktů o velikosti 100 až 2000 bp, jenž byly výsledkem spektra rozličně viditelných pruhů (elektroforegramů). Je-li pruh přítomen je převeden na binární matici, kde se hodnotí přítomnost produktu „1“ a nepřítomnost „0“ z čehož mezi vybranými zkoumanými vzorky po statistickém vyhodnocení vyplývají vzájemné genetické vztahy (Hahn a Grifo, 1996).

Tabulka 1 Příklad složení mastermixu pro RAPD reakci

	Koncentrace výchozí	Koncentrace reakcí	1 reakce (μ l)	Mix ... x (μ l)
H ₂ O			19,55	
10 x Buffer	10 x	1 x	2,5	
DTP	25 mM	0,2 mM	0,2	
Primer	20 μ M	0,4 μ M	0,5	
Polymeráza	2 U/ μ l	0,5 U	0,25	

(převzato z Baránek *et al.*, 2006).

RAPD markery mají v diploidních organismech dominantně/recesivní charakter, tím se rozumí, že fragment DNA o určité molekulární hmotnosti je amplifikován pouze u některých jednotlivců. Nejde tedy rozlišovat heterozygotní organismy od homozygotních (Baránek *et al.*, 2006).

Metoda RAPD má schopnost zjistit polymorfismus i v oblastech DNA, kde není rozeznatelná sekvence, funkce nebo lokalizace na chromosomu (Hahn a Grifo, 1996; Wolfe a Liston, 1998; Spooner *et al.*, 2005). Při analýze RAPD je možné tedy zachytit mutace v daleko větším pásmu, než která pokrývají místa komplementarity templátové DNA a primeru (Baránek *et al.*, 2006).

Výhoda této metody spočívá v její jednoduchosti, rychlosti a technické nenáročnosti. Nevýhodou je však potíže s opakovatelností a nízkou reprodukovatelností, která je ovlivňována kvalitou a množstvím templátové DNA, PCR pufru, koncentrací chloridu hořečnatého, poměrem primeru/templátu, teplotou nasednutí primeru, typu DNA polymerázy a druhu termocykleru (Hahn a Grifo, 1996; Wolfe a Liston, 1998; Spooner *et al.*, 2005). Výsledky RAPD metody jsou brány za spolehlivé i v případě nižší reprodukovatelnosti mezi laboratořemi (Welsch and McClelland, 1990).

Použitými molekulárními markery bylo zjištěno, že jsou vhodné při rozlišování různých genofondů získaných z různých zeměpisných oblastí (Khanuja *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Technika byla také použita pro určení složek čínského bylinného předpisu, yu-ping feng san (McCouch *et al.*, 1988). RAPD markery pomáhají ke stanovení genetické příbuznosti a rozlišení kultivarů u několika ovocných plodin zahrnujících mandloň (Bartolozzi *et al.*, 1998), broskvoň (Badenes *et al.*, 1995), jabloň (Koller *et al.*, 1993), švestku (Boonprakob *et al.*, 2001), meruňku (Ercisli *et al.*, 2008), papáju (Jobin-Decor *et al.*, 1996), guavu (Prakash *et al.*, 2002), révu (Ulanovsky *et al.*, 2002), růži šípkovou (Debener *et al.*, 1996), citrus (Ji *et al.*, 2011) a tomel (Thaipong *et al.*, 2003).

Marilyn *et al.*, (1996) zkoumali genetickou variabilitu broskvoní v různých oblastech Spojených států. Sledovali náhodně amplifikovanou polymorfni DNA za pomoci RAPD markerů a výsledky srovnali s výsledky z příbuzenského křížení daných broskvoní. Použili 94 RAPD markerů pro odhad genetické vzdálenosti mezi 136 kultivary. Rozdělili je do 12 klastrů vytvořených v dendogramu, z čehož tři klastry obsahovaly genotypy z USA, Evropy a Latinské Ameriky a zbylých devět klastrů genotypy z Indie, Pákistánu, Ruska, z Okinawy a Číny. Z daného výzkumu vyplývá, že většina alel u sledovaných odrůd v daném státě je totožná, i přesto, že se tyto odrůdy liší svým geografickým (zeměpisným) původem (Warburton and Bliss, 1996).

6.5 Metoda AFLP

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (z anglického *Amplified fragment length polymorphism*) byl představen Zabeauem (1993), Vosem *et al.*, (1995) a představuje geniální kombinaci analýzy RFLP a PCR. Technologie AFLP je použitelná pro všechny organismy a obecně má za následek vysokou informativnost o DNA. Proto se stala rychle jednou z nejoblíbenějších a výkonných přístupů k detekci polymorfismů DNA.

AFLP reakce zahrnuje dva základní kroky. V prvním kroku je genomová DNA štěpena dvěma různými restričními enzymy produkující lepivé (kohezní) konce a dvouvláknové syntetické adaptéry definující sekvence jsou vázány k oběma koncům všech restričních fragmentů. Adaptér a omezování sekvenačních míst pak poskytují univerzálnímu primeru vazebná místa pro následné PCR reakce, které tvoří druhý krok.

Následné PCR reakce se provádí prostřednictvím speciálně navržených primerů. 5'-konec primerů je komplementární k adaptéru, zatímco 3'-konec je potřeba prodloužit o několik, libovolně vybraných nukleotidů do restrikčního fragmentu. Přesná shoda na 3'-konci primeru je nezbytná pro amplifikaci.

Proto pouze ty restrikční fragmenty jsou zviditelněny, ve kterých jsou 3'-konce primerů rozšířeny, a tím odpovídají sekvenci lemující restrikční místa (Weising *et al.*, 2005).

Polymorfismus mezi dvěma nebo více genotypy může vzniknout ze tří zdrojů: 1. změnou sekvence v jednom nebo na obou restrikčních místech, lemující určitý fragment (jako v RFLP), 2. vložení nebo vymazáním sekvence uvnitř amplifikovaného fragmentu (jako v RFLP), 3. vznikem rozdílů v nukleotidové sekvenci, která přímo sousedí s restrikčními místy (nelze provést analýzou RFLP) (Weising *et al.*, 2005).

AFLP tedy dokáže detekovat vyšší úroveň polymorfismu než RFLP. AFLP markery jsou většinou dominantní, ale někdy může být dědičnost vyhodnocena i jako kodominantní.

Technologie AFLP se vyznačuje kombinací významných výhod. Za prvé, je všestranná, lze použít libovolný primer, protože není nutná znalost o předem dané sekvenci primeru. Za druhé, vyšší kontrolovatelnost v průběhu PCR reakce, může zajistit důkladnost a vysokou opakovatelnost této metody. Za třetí, vybraný pruh může být vyříznut, klonován, sekvenován a transformován do zasaženého místa, podle navržených specifických primerů. Za čtvrté, určitý počet AFLP primerů lze kombinovat, čímž se získá značné množství kombinace primerů, z nichž každý produkuje jedinečnou sadu amplifikovaných fragmentů. Za páté, mnohonásobá kombinace primerů je nejen vysoká (tj, řada informativních pruhů je vytvořena v jednom experimentu), může být také přizpůsoben prostřednictvím proměnné délky na 3'-primeru prodloužením, anebo výběrem enzymu. Proto je zapotřebí pouze jeden nebo dva selektivní nukleotidy pro templáty s nízkou komplexností, jako jsou bakteriální genomy, vzhledem k tomu, může být zapotřebí až osm selektivních nukleotidů pro druhy s velmi rozsáhlými genomy. Typický fragment má velikost v rozpětí od 50 do 500 bp (Weising *et al.*, 2005).

Výhoda AFLP spočívá v tom, že je brána jako všestranný nástroj pro řadu aplikací, včetně molekulární taxonomie, populační genetiky, charakterizací sbírek zárodečných plazem, identifikaci klonů, sportů a kultivarů, výstavbou genetického spojení map, prostoupení markerů ve specifických oblastech genomu, pro fyzické mapování, a mnoho dalších.

Přestože se jedná o velmi výkonnou metodu, základní analýzy AFLP mají také řadu omezení, jako je dominance markerů, shlukování markerů, které jsou vytvářeny s určitým párem restriktivního enzymu v odlišných oblastech genomu, omezené úrovně polymorfismu u některých pěstovaných druhů, požadavek na kvalitní DNA (Weising *et al.*, 2005).

Xu *et al.* (2006) zkoumali prostřednictvím metody AFLP genetickou variabilitu a genetické vztahy mezi japonskými broskvoňovými kultivary a zjišťovali původ daného broskvoňového kultivaru. Sledovali 17 japonských komerčních broskvoňových kultivarů a 6 tradičních kultivarů. Z 16 kombinací AFLP primerů bylo zachyceno celkem 837 produktů a 146 polymorfních pruhů s procentem polymorfismu 17,5 %. Z 6 tradičních položek, byly 4 geneticky variabilní od japonských komerčních odrůd broskvoní, zatímco 2 položky z Číny byly klasifikovány do skupiny japonských komerčně pěstovaných broskvoňových kultivarů.

Analýza AFLP a sledování původu ukázaly, že japonské komerční broskvoňové kultivary pocházejí zejména z kultivaru 'Shanghai Suimitsutou', jedné z tradičních položek z Číny. Ačkoli genetické vztahy zjištěné pomocí AFLP byly obecně v souladu s informacemi o původu, byly nalezeny odlišnosti. Kombinace AFLP výsledků s genetickými informacemi (údaji o původu daného broskvoňového kultivaru) můžou poskytnout lepší pochopení genetických vztahů mezi japonskými broskvoňovými kultivary (Xu *et al.*, 2006).

AFLP technika poskytuje novou a velmi silnou metodu DNA fingerprintingu pro DNA jakéhokoliv původu nebo složitosti (Vos *et al.*, 1995).

6.6 Metoda SSR

Mikrosatelity, neboli opakující se jednoduché sekvence (z anglického „*Simple Sequence Repeats*“). Tuto metodu objevil na počátku 70. let. SKINNER *et al.*, (1974), při nálezu sekvence (TAGG)_n v satelitní DNA, která se nacházela u kraba poustevníka. Jsou popisovány jako sled pravidelně se opakujících krátkých sekvencí v eukaryotickém genomu. Koncem 80. let. byl určen odborný výraz mikrosatelity, který patřil pro nově zavedenou skupinu primerů (Litt and Luty, 1989; Weber and May, 1989; Beckmann and Soller, 1990).

Mikrosatelity v DNA reprezentují oblasti složené z 1-6 nukleotidů vícekrát se opakujících, příkladem jsou (A/T)_n, (AG/CT)_n, (GATA/TATC)_n. Tyto opakující se nukleotidy jsou nazývány jednotky repetice (Rosypal, 2001). Jejich optimální délka se pohybuje pod 100 pb. Struktura mikrosatelitů je rozlišována na dokonalé, nedokonalé a složené. Pokud je struktura utvářena souvislou jednotkou repetice, jedná se o dokonalý mikrosatelit, např. je (AG)₂₄, v případě, že je jednotka repetice přerušena sledem náhodných bází, jde o mikrosatelit nedokonalý, např. (AG)₁₄(AT)₃₅. Přítomnost mikrosatelitů se mezi různými organizmy mění, avšak v rámci vyšších organizmů jsou značně rozšířeny. Frekvence výskytu mikrosatelitů u genomů rostlin je zhruba pětikrát nižší než v lidském genomu. Zjistilo se, že nejvíce jsou zastoupeny dinukleotidové mikrosatelity, z nich se jedná o jednotku repetice (AT)_n. K méně početným pak patří mono- a tetranukleotidové mikrosatelity. V oblasti trinukleotidových repetací jsou nejběžnější (AAG/CTT)_n a (AAT/ATT)_n (Baránek *et al.*, 2006).

Jednoduché opakující se sekvence (SSR nebo mikrosatelity) se běžně používají v genetických studiích, protože jsou široce rozšířeny v celém genomu, jsou kodominantní a vysoce polymorfní. Byly izolovány z různých druhů z čeledi *Rosaceae* a jsou široce používány pro takové postupy, jako analýza genetické variability, identifikace kultivarů, fingerprinting a tvorbu genetických map (Aranzana *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 2007; Fotiric *et al.*, 2007).

Mikrosatelity jsou v genomu pravidelně uspořádané a představují relativně vysokou míru polymorfismu mezi jednotlivými genotypy, která je zapříčiněna rozdílným počtem opakujících se jednotek repetice. Z tohoto důvodu metoda SSR používá primery z konzervativních sekvencí v úzké blízkosti s mikrosatelitním lokusem. Sekvence PCR primerů jsou vytvářeny tak, aby se jejich délka pohybovala v intervalu 17-22 pb, obsah G a C byl zhruba 50 % a vypočítaná hodnota T_m zůstala okolo 60°C. Vytvořený primer nesmí vykazovat vnitřní ani vzájemnou komplementaritu, pokud by tomu tak nebylo, mohlo by to výrazně narušit celý průběh PCR reakce. K jednodušší detekci produktů amplifikace bývají primery vytvářeny tak, aby se rozsah produktu amplifikace nacházel v rozmezí 100 – 300 pb. Jak bylo dříve uvedeno, polymorfismus mezi genotypy je způsoben odlišným počtem opakování jednotky repetice. Z toho vychází, že během detekce produktů PCR jsou jednotlivé alely odlišeny o jednotku délky repetice určitého mikrosatelitu, např. při jednotce repetice AT nastane rozlišení mezi alelami 2 pb, při jednotce repetice ATT nastane rozlišení mezi alelami 3 pb) (Baránek *et al.*, 2006).

Tabulka 2 Příklad složení mastermixu pro SSR reakci

	Koncentrace výchozí	Koncentrace v reakci	1 reakce (μl)	Mastermix....x
H ₂ O			18,8	
10 x Buffer	10 x	1 x	2,5	
dNTP _s	25 mM	0,2 mM	0,2	
Primer S	10 μM	0,2 μM	0,5	
Primer A	10 μM	0,2 μM	0,5	
Polymeráza	2U/μl	1 U	0,5	

(převzato z: Baránek *et al.*, 2006).

Příkladem použití mikrosatelitů u broskvoní je práce Testolin *et al.*, 2000. Bylo izolováno a sekvenováno 26 mikrosatelitů ze dvou genomových odrůd broskvoní. Kultivar 'Redhaven' byl ještě obohacen o AC / GT a AG / CT. U 17 z těchto mikrosatelitů, bylo možné prokázat mendelistický typ dědičnosti. Polymorfismus byl testován u 50 kultivarů broskvoní a nektarinek. Množství 2-8 alel na lokusu ukazuje, že všechny mikrosatelity byly polymorfní.

Sada mikrosatelitů rozlišila všechny sledované kultivary, s výjimkou několika mutací u Dixitime´ vs. ´Springcrest´, ´Redhaven´ vs. ´Redhaven´, a dvou párů kultivarů, ´Venuše´ vs. ´Orion´ a ´Elegant Lady´ vs. ´Rome star´, jejichž původy jsou sporné. Bylo analyzováno otcovství několika odrůd a ve většině případů byla rodičovství potvrzena (Testolin *et al.*, 2000).

7. Diagnostika patogenů u broskvoní

Získávání informací o genetické variabilitě a struktuře u druhu *Prunus* může poskytnout užitečné genetické informace pro šlechtění nových kultivarů a pro další genetické výzkumy. V současné době, molekulární markery umožnily určení genetické variability pro volně se vyskytující a kulturní genotypy.

Pomocí molekulárních metod lze u broskvoní sledovat výskyt patogenů, popř. studovat rezistence k těmto patogenům u jednotlivých kultivarů nebo v potomstvech.

7.1 Houbové choroby

Využití PCR metody je vhodné také při diagnostice houbových chorob.

Taphrina deformans (kadeřavost broskvoně)

Vřeckovýtrusá houba *Taphrina deformans* je zprostředkovatelem kadeřavosti broskvoně. Celosvětové onemocnění ničí výnosy plodin broskvoní. Nápadné symptomy kadeřavých listů jsou brány jako výsledek vniknutí parazitního mycelia do hostitelské tkáně. Úspěšná izolace houby v čisté kultuře je omezena pouze na pozdní jaro či časně léto (doba vypouštění askospor z infikovaných listů).

Molekulární metody na základě hybridizace nukleových kyselin, jsou výhodné pro diagnostické účely, protože nevyžadují izolaci houby na kultivační médium. Přímá amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a fluorescenční hybridizace (FISH) poskytují rychlou a spolehlivou metodu pro hodnocení rizika onemocnění. Specifické primery a sondy byly navrženy na základě dostupných údajů ribozomální DNA sekvence (Giosué, 2000).

Program řízeného křížení v letech 1990 – 1999, byl proveden pro získání odrůd broskvoní odolných proti kadeřavosti broskvoně. U potomstva 'DOFI-84,364', které bylo získané samosprašně 'DOFI 71.043.018' ('*Cesarini* x *Cesarini*') se předpokládá, že bude tolerantní k *T. deformans*. Stromy nebyly ošetřeny fungicidy v posledních dvou letech před výzkumem. A dosud všechny dosažené výsledky ukazují vysoký stupeň rezistence potomstva 'DOFI-84,364'. Potomstvo 'DOFI-84,364' se při analýze RAPD markery s 20 předem vybranými primery, prokázalo jako homogenní. Diferenciální genová exprese byla analyzována pomocí RAP (RNA fingerprinting libovolných primerů) techniky ve zdravých listech (Bellini *et al.*, 2002).

Sphaerotheca pannosa (padlí broskvoně)

Napadá listy, letorosty a zejména plody. Podhoubí parazita se utváří na listech ve formě bělavých nebo světle růžových velkých skvrn. Dochází k opadu, deformaci listů a nekrotám. Napadení letorostů dochází zejména v letních měsících, kdy jsou letorosty pokryty zpočátku bílým (primárním) a poté hnědým (sekundárním) podhoubím. Pletiva od vrcholku zasychají, praskají a ukončují růst. Plody jsou pokryty zpočátku bílým a poté hnědým podhoubím, které se vyznačuje odlišně velkými, okrouhlými a splývajícími skvrnami. Během napadení dochází ke snížení kvality a znehodnocení plodů (Státní rostlinolékařská správa, 2002).

V roce 2004, došlo k těžké infekci *Sphaerotheca pannosa* v Al-Jabal Al-Akdhar, Ománu, která měla za následek značné ztráty na výnosech pěstitelů. Tato studie byla provedena na základě výskytu a působení patogena. *Sphaerotheca pannosa* byla pozorována ve všech farmách na broskvoních v Al-Jabal Al-Akdhar. Příznaky onemocnění byly nejprve pozorovány na výhoncích v dubnu a následně na vzhledu ovoce. Závažnost onemocnění dosáhla svého vrcholu mezi květnem a červnem. Morfologická a molekulární identifikace 22 izolátů *Sphaerotheca pannosa* ukázala, že všechny patří do *Sphaerotheca pannosa*. *Sphaerotheca pannosa* jevila stejné příznaky i na očkovaných listech broskvoní. AFLP analýza vyznačila z 35 izolátů napadených *P. pannosou*, které pocházely z pěti různých oblastí, za pomoci kombinace čtyř primerů, 688 polymorfní lokusů a 35 různých genotypů. V daných izolátech má *P. pannosa* nízkou hladinu genové diverzity, což naznačuje, že *P. pannosa* byla teprve nedávno zavedena do Al-Jabal Al-Akdhar. Analýza molekulární variance vykazovala nízké hladiny genetické diferenciace mezi izoláty z různých vesnic, což znamená, že *P. pannosa* byla do různých vesnic zavedena společným zdrojem (Al-Sadi *et al.*, 2012).

7.2 Bakteriální onemocnění

Bakteriální poškození, způsobené *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, je závažné onemocnění, které může mít vliv na kvalitu a produkci broskvoní po celém světě. Toto onemocnění způsobuje vážný opad listů a narušení ovoce, a to zejména v oblastech s nadprůměrnými srážkami, silným větrem, vysokou vlhkostí a s písčitymi půdami. Yang *et al.*, studovali genetiku broskvoní v reakci na bakteriální poškození. Byla vytvořena F-2 segregující populace mezi dvěma broskvoňovými kultivary, 'Clayton', který má odolný fenotyp, a 'O'Henry', který je velmi citlivý na bakteriální poškození. Fenotypové údaje byly odebrány na dvou místech: Sandhills Research Station, Jackson Springs, Severní Karolína (NC), kanadský výzkum a vzdělávací centrum, Pontiac, South Carolina (SC). Z 574 SSR markerů odebraných z *Prunus*, bylo pouze 7% (38) mezi rodiči informativními a použity k vytvoření genetické mapy (Yang *et al.*, 2013).

Xanthomonas campestris pv. *pruni* je hlavním problémem broskvoní a nektarinek, ale objevuje se také na meruňkách, švestkách a v menší míře na třešních. Důsledkem bakteriálního zasažení je nejčastěji opad listů, což může vést až k odumření stromu. Odolnost proti bakterii *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* by měla být prvořadým hlediskem při výběru broskvoňové odrůdy. Některé z více rezistentních odrůd jsou 'Bell Gruzie', 'Biscoe', 'Harken', 'Loring', 'Madison', 'Ranger', 'Redhaven', 'Redskin' a 'Sunhaven'. K velmi citlivým odrůdám patří 'Elberta July Elberta', 'Halehaven', 'Sunhigh' (Bost, 1914).

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* může být přenášena pomocí rostlinného materiálu. Nová a vysoce citlivá real-time TaqMan PCR byla navržena na základě sekvence genu pro protein související s ABC transportérem na ATP-vazebný systém v *X arboricola* pv. *pruni*. Detekce patogenu může být dokončena během několika hodin s citlivostí 102 CFU ml⁻¹, čímž překonala citlivost stávající konvenční PCR. Specifita byla hodnocena pro *X. arboricola* pv. *pruni* s odlišným původem, saprofytické bakterie a zdravé vzorky *Prunus*. Účinnost real-time TaqMan PCR byla vyhodnocena s terénních vzorků ze 14 druhů a podnoží rodu *Prunus*. U vzorků listů, které vykazovaly příznaky napadení, byla real-time TaqMan PCR velmi účinná. U 117 bezpříznakových listů a 285 pupenů, byla *X. arboricola* pv. *pruni* detekována u 9,4% a 9,1% z 402 analyzovaných vzorků, což dokazuje jeho časté epifytické nebo endofytické fáze. Tato nově vyvinutá real-time TaqMan PCR lze použít jako kvantitativní test pro rostlinný materiál (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

7.3 Virové choroby

Plum pox virus (PPV), původce šarkového onemocnění v čeledi *Prunoideae*, je jedním z nejzávažnějších problémů, které ovlivňují produkci peckovin v Evropě a Americe. Odolnost proti PPV byla dříve popsána v *Prunus davidiana* klonu P1908. Genetická odolnost proti PPV zobrazuje komplexní (složitý) vzor kvantitativního dědictví. Analýza kvantitativního znaku (QTLs) odolnosti, byla provedena na F1 mezidruhových broskvoňových populacích. Daný znak byl získán z křížení mezi nektarinkami z kultivarů 'Summergrand' a *P. davidiana*. Hybridi byli roubováním naočkováni PPV. Výskyt infekce byl vyhodnocen čtyřikrát. Nejprve pozorováním příznaků v průběhu dvou vegetačních cyklů, a poté enzymem imunisorpční analýzy (ELISA). Použitím jak analýzy rozptylu, tak neparametrických testů, bylo zjištěno, že šest genomových oblastí podílející se na PPV je rezistentních. Podle vyhodnocených údajů lze usoudit, že mezi 22 a 51 % se nachází fenotypová odchylka, která by mohla být vysvětlena v kvantitativním modelu. Jeden QTL znak mapuje v genomové oblasti umístění genu rezistence, který byl dříve identifikován v meruňce 'Goldrich'. Některé QTL znaky se zdají být dočasně specifické, což odráží závislost na životním prostředí ve vyhodnocování odolnosti proti PPV. Genové fragmenty byly amplifikovány pomocí PCR (Decroocq, 2005).

Byla studována rezistence 15 broskvoňových kultivarů na PPV. Choroboplodnost (patogenita) tohoto kmene viru v broskvoních byla kontrolována od očkování na listy v horní části koruny po plody, až k infikovaným sazenicím u broskvoně 'Elberta' a *Prunus persica* 'Stockes'.

Všech 15 broskvoňových odrůd vykazovalo odolnost vůči testovanému viru. Virus nezpůsobil žádné systémové infekce v jakékoliv odrůdě. Pouze byl lokalizován v bezprostřední blízkosti naočkovaného místa. Příznaky PPV se vyskytovaly pouze na 3 z 50 plodů očkovaných sazenic broskvoně 'Elberta' ještě 12 let po očkování. Z jednoho z těchto semenáčků byl virus předán roubováním pouze 5 z 15 očkovaných sazenic GF 305. Sazenice z 'Elberta' byla současně na 15 GF 305 podnoži, ale virus nemohl být zjištěn v žádné z těchto rostlin v následujícím roce.

PPV ukázal nízkou patogenitu na sazenicích *P. persica* 'Stockes', protože se v nich rozšířil velmi pomalu. V infikovaných listech z horní části koruny nebyl detekován virus v 10 z 12 testovaných semenáčků i po 12 letech. Kromě toho, virem se testované plody nenakazily v žádném z případů (Rankovic and Šutic, 1985).

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) je škodlivý patogen broskvoní, jeho detekce má zásadní význam pro sanitární a certifikační programy po celém světě. Byla použita kvantitativní real-time reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) pro zlepšení diagnózy tohoto patogenu. Rozhodující je návrh konkrétní sady primerů a sond, a použití vhodné metody extrakce pro diagnózu PLMVd (Luigi and Faggioli, 2011).

7.4 Fytoplazmy

Během terénních průzkumů v letech 1999 a 2000 v broskvoňových sadech v Severní a Střední Itálii, byly pozorovány rostliny různých odrůd s příznaky předčasného zarudnutí listů, abnormálního ztlustění střední žilky a primárních žil, podzimního růstu latentních pupenů, které produkují malé květy. Tyto příznaky jsou spojeny s *European stone fruit yellows phytoplasma* (ESFY). V kontrolovaných sadech byly infikovány 1-4 % stromů. Ve většině symptomatických vzorků, byla ESFY detekována pouze s použitím různých diagnostických metod: [4', 6'-diamidino-2-fenylindol, 2HCl (DAPI), polymerázová řetězová reakce (PCR) s ribosomálními a non-ribosomálními páry primerů, PCR-enzym-linked immunosorbent assay, nested-PCR]. Imunoenzymatická detekce PCR produktů se sondou patogena zajistila specifickou a rychlou detekci ESFY. Jedná se o první průzkum pro posouzení výskytu fytoplazem v broskvoňových sadech v Severní a Střední Itálii (Pollini *et al.*, 2001).

Devastující onemocnění *Almond Witches'-Broom phytoplasma* (AlmWB) se rychle šíří v Libanonu, způsobí odumření asi sta tisícům stromů do 10 let. Předběžné výsledky experimentů z roubování dokázaly, že AlmWB mohly být předány roubováním na mandloně, broskvoně, nektarinky, ale ne na meruňky, švestky a třešně. Výskyt tohoto onemocnění se pohybuje v nadmořské výšce až 1000 m. Je hlavní potenciální hrozbou pro mandloně, nektarinky a broskvoně. Pro detekci jsou použity univerzální primery a nested polymerázová řetězová reakce (Abou-Jawdah *et al.*, 2003).

Příznaky onemocnění fytoplazem byly pozorovány na nektarinkách (*Prunus persica* var. 'Nucipersica') a broskvoních (*P. persica*) v Sarada, na jihu Libanonu. Přítomnost fytoplazem v obou sadech byla potvrzena nested polymerázovou řetězovou reakcí za použití univerzálních primerů. Amplifikované DNA fragmenty byly klonovány a sekvenovány. Blast analýza více než 1000 nukleotidů prokázala přítomnost 'Candidatus fytoplazem phoenicium'. Tato phytoplasma zlikvidovala tisíce mandloní v Libanonu a Íránu. Předchozí zprávy ukázaly, že 'Candidatus fytoplazem phoenicium' mohla být přenesena roubováním na broskvoně a nektarinky v experimentálních podmínkách. Toto je první zpráva o přírodním a epidemickém šíření 'Ca. Fytoplazem phoenicium' v broskvoních a nektarinkách. Zemědělcům v regionu bylo doporučeno, aby okamžitě odstranili infikované stromy (Abou-Jawdah *et al.*, 2009).

7.5 PTSL

Peach tree short life (PTSL) je likvidující syndrom onemocnění broskvoní (*Prunus persica* (L.)), který je způsoben několika faktory. Jeho molekulární biologická odolnost není doposud známa. Obtížnost studie PTSL je v tom, že příznaky PTSL nejsou na první pohled do 3-5 roku po výsadbě znát, a tudíž není zřejmé, zda poté strom přežije nebo uhynie. Tolerance k PTSL byla v *Prunus* neznámá. V roce 1994 byl kvůli genetickému studiu v komerčních sadech zaveden do podnože 'Guardiang' (R) "BY520-9" PTSL. Řízené křížení F-2 proběhlo u 'Guardiang' (R) "BY520-9", výběrem 3-17-7 (PTSL-tolerantní) a 'Nemaguard' (PTSL-citlivý). F1 byl hybridní a po samoopylení vygenerovat F2 populaci, od které se očekávala PTSL reakce. 151 AFLPs a 21 SSR markerů, včetně lokusů z *Prunus* odkazují na genetickou mapu. Tato mapa zahrnuje genetické vzdálenosti o 737 cm s průměrným markerovým rozestupem 4,7 cm a bude použita jako základ pro konstrukci molekulární genetické mapy. Ze 140 mapovaných AFLP markerů, jich bylo spojeno 38 s PTSL reakcí, jak bylo stanoveno v dřívější analýze (Blenda *et al.*, 2007).

8. Fingerprinting

DNA fingerprinting je metoda genetické identifikace, která se používá například k ověřování pravosti odrůd. Pro identifikaci lze použít jak proteinové tak i DNA markery. Velkou předností DNA markerů je vyšší úroveň polymorfismu a stabilita analyzované DNA, která je nezávislá na podmínkách prostředí. Pro charakterizaci určitého materiálu je možné využít různých základních metod fingerprintingu. Tyto metody jsou založeny buď na PCR, která využívá principu PCR k exponenciálnímu namnožení náhodně vybraných úseků genomové DNA, nebo na hybridizaci. Počet a délka získaných fragmentů je specifická pro každou konkrétní kombinaci náhodného primeru a genotypu. Po rozdělení získaných fragmentů na elektroforéze získáme charakteristický otisk DNA nazývaný fingerprint. Kromě RAPD lze využít i SSR, RFLP a AFLP metody k charakterizaci hybridů a rodových linií (Porubová a Hájková, 2005).

Tradiční identifikace odrůd broskvoní a nektarinek se opírá o hodnocení agronomických vlastností dospělé rostliny. V práci Manubens *et al.*, 1999 je popisována metoda pro rychlé hodnocení odrůd broskvoní a nektarinek na základě AFLP fingerprintingu a extrakci vysoce kvalitní DNA. Nejlepší páry primerů byly vybrány z 64 primerních kombinací, které spolehlivě rozliší 8 odrůd broskvoní a 6 odrůd nektarinek. Grafické znázornění detekovaného polymorfismu prokázalo zjednodušení dané analýzy (Manubens *et al.*, 1999).

V rostlinách byla přítomnost mikrosatelitů poprvé prokázána RFLP fingerprinting s oligonukleotidovými sondami toto nedává smysl (Beyermann *et al.*, 1992).

Protokol amplifikace DNA fingerprintingu (DAF) navrhl Caetano-Anollés *et al.*, DAF využívá velmi krátkých primerů (často pouze pět až osm nukleotidů) v poměrně vysokých koncentracích (~3 μ M) a využívá dvou namísto tří teplotních cyklů v PCR. Výsledné fragmenty, zviditelněné za pomoci obarvení stříbrem, jsou vyluštny a zachyceny v polyakrylamidovém gelu (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1994).

9. Transpozóny ISSR

Transpozon čili transpozibilní element je segment DNA, který je schopen měnit svou pozici v genomu (Cammack *et al.*, 2006).

Jsou významnou součástí rostlinných genomů, ovlivňující jejich fungování i evoluci. U některých druhů tvoří až 90% genomu. Transpozony obsahují důležité regulační oblasti, o nichž bylo nedávno zjištěno, že obsahují sekvence schopné tvořit vícevláknové konformace DNA - kvadruplexy a triplexy, které ovlivňují rekombinaci DNA (Lexa and Kejnovský, 2015).

Okrasná broskvoň (*Prunus persica* (L.) má mnoho významných a oblíbených kultivarů. Ačkoli mnoho z nich bylo široce používáno v městské krajině a zahradách, jejich genetický vztah není zcela jasný. ISSR markery byly použity pro analýzu genetických vztahů mezi 16 taxony okrasných broskvoní. Všechny 100 dostupných primerů bylo testováno na dvou odrůdách a deset primerů z nejvíce polymorfní skupiny bylo vybráno pro tuto studii. Bylo vytvořeno celkem 132 markerů s 300 až 1400 bp. Mezi nimi bylo 62 % pruhů polymorfních markerů. Průměrný počet byl 80 markerů pro každý taxon. *Prunus davidiana* (Carr.) byl zřejmě výchozí skupinou k *P. persica*. Její dvě hybridní odrůdy byly seskupeny do klastru. Z 69 % byla prokázána genetická shoda *P. davidiana* s okrasnými broskvoňovými kultivary, a proto mají tyto odrůdy genetickou odlišnost ke kultivarům *P. persica*. Výsledky ukázaly, že ISSR markery jsou užitečnou technikou pro odhalení skupin (jiný rodokmen a jiný tvar růstu) a genetických vztahů okrasných broskvoní. ISSR-PCR systém pro okrasné broskvoně by v této studii mohl napomoci v budoucnu okrasným broskvoním v rozlišování původu, k ochraně a k vývoji nových kultivarů (Hu *et al.*, 2006).

10. Mapování DNA

Mapování a sekvenování rostlinných genomů napomáhá k objasnění genové funkce, jeho regulaci a expresi. Genetické mapy byly vytvořeny pro mnoho kulturních plodin. Mapování je jednou ze základních a nezbytných metod v genetice, kdy se molekulární markery používají k identifikaci požadovaných genů. Mapa může definovat genetické vzdálenosti mezi jednotlivými geny na DNA. Vazebné mapy, založené na morfologických a izoenzymových markerech molekulárních markerech, byly konstruovány pro rýži, kukuřici, pšenici, ječmen a mnoho dalších kulturních plodin. Je důležité znát umístění genů určujících fenotypové znaky. Kromě toho je exprese morfologických znaků ovlivněna stavem životního prostředí.

Polymorfismus v nukleotidové sekvenci je obvykle dostačující pro to, aby působil jako molekulární marker v mapování. Tyto polymorfismy jsou zjišťovány molekulárními metodami, jako je RFLP, AFLP, *microsatellite or simple sequence repeat polymorphism* (SSR), *DNA RAPD*, *cleavable amplified polymorphic sequences* (CAPS) a *single strand conformation polymorphism* (SSCP) (Mohan, 1997).

Genetická mapa broskvoně *Prunus persica* (L.) byla konstruována s cílem identifikovat molekulární markery, spojené s hospodářsky významnými agronomickými znaky. Vnitrodruhová F2 generace byla generována ze samosprašných odrůd F1 generace, která proběhla křížením mezi plochou nekyselou broskvoní, 'Ferjalou Jalousia' a kulatou kyselou nektarinkou 'Fantasia'. Bylo pozorováno 270 markerů, včetně čtyř agronomických znaků (broskvoň / nektarinka, ploché / kulaté ovoce, kyselina / non-kyselinou vinnou, a sterilita pylu) a 1 izoenzymu, 50 RFLP, 92 RAPD, 8 *inter-microsatellite amplification* (IMA) a 115 *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) markerů. 249 markerů bylo mapováno do 11 vazebných skupin. Čtyři agronomické znaky byly identifikovány molekulárními markery. Mapa bude použita pro detekci QTL kontrolující kvalitu ovoce v broskvoních, a zejména jejich obsah kyselin a cukrů (Dirlewanger, 1998).

11. Vlastní komentář k řešení problematice

Tabulka 3 Nejvýraznější výhody a nevýhody jednotlivých molekulárně genetických technik

KRITÉRIA	AFLP	RAPD	SSR	RFLP
Množství získaných informací	Vysoké	Vysoké	Vysoké	Nízké
Opakovatelnost	Střední – vysoká	Střední – vysoká	Vysoká	Vysoká
Rozlišení genetických rozdílů mezi objekty	Vysoké	Střední	Vysoké	Střední
Nároky protokolu na vybavení a zručnost	Střední – vysoké	Nízké	Střední	Střední
Čas potřebný k jejich zavedení v laboratoři	Krátký	Krátký	Povětšinou dlouhý	Dlouhý

(Baránek *et al.*, 2006).

RFLP metoda byla první metodou založenou na bázi DNA. Jako jediná není založena na principu PCR. Princip této metody je založen na použití restričních endonukleáz a hybridizace DNA. Identifikuje určité typy onemocnění. Dnes už je však kvůli nízkému množství získaných informací a velké finanční náročnosti méně užívanou metodou. Má však oproti tomu kodominantní markery a vysokou opakovatelnost. Polymorfismy, které jsou dostatečné pro RFLP mapování, našli např. Eldredge *et al.*, roku 1992.

Další metody RAPD, AFLP a SSR jsou založeny na principu PCR.

RAPD metoda používá pouze jeden primer, u kterého není třeba znát konkrétní sekvence cílových oblastí DNA. RAPD markery slouží k odlišnosti genetických typů a populačních studií. Jsou schopny zachytit mutace. Výhodou této metody je jednoduchost a rychlost. Lze získat vysoké množství spolehlivých informací. Nevýhodou je zde střední opakovatelnost s nízkou reprodukovatelností a markery této metody jsou dominantní.

RAPD metodu použili např. Marilyn *et al.*, (1996). Zkoumali genetickou variabilitu broskvoní, kde sledovali náhodně amplifikovanou polymorfni DNA za pomoci RAPD markerů.

AFLP metoda používá univerzální primery. Výhodou je, že použitím libovolného primeru, získáme vysokou míru polymorfismu. Tato metoda je všestranná se střední opakovatelností. Markery jsou dominantní, proto je zde omezen polymorfismus. Xu *et al.* 2006 a Vos *et al.* 1995 zkoumali prostřednictvím metody AFLP a DNA fingerprintingu genetickou variabilitu a genetické vztahy mezi kultivary, čímž zjišťovali původ daného kultivaru.

SSR metoda představuje vysokou míru polymorfismu mezi jednotlivými genotypy, jelikož jsou její markery kodominantní. Má vysokou míru opakovatelnosti a lze získat vysoké množství informací. Testolin *et al.*, 2000, prokázali díky SSR metodě, u několika odrůd broskvoní a nektarinek, mendelistický typ dědičnosti.

Dle množství získaných informací se nejlépe jeví metody AFLP, RAPD a SSR, RFLP metoda má naopak velmi nízké procento získaných informací. Vzhledem k opakovatelnosti daných metod je vysoká u SSR a RFLP, u AFLP a RAPD je středně vysoká. AFLP a SSR metody mají vysoké rozlišení genetických rozdílů mezi objekty, RAPD a RFLP metody mají střední rozlišení genetických rozdílů mezi objekty. Největší nároky protokolu na vybavení a zručnost má metoda AFLP, metody SSR a RFLP mají nároky střední a RAPD má nízké nároky. Vysoce náročná na čas potřebný k zavedení v laboratoři je metoda RFLP a povětšinou i SSR, metody AFLP a RAPD jsou zavedeny v poměrně krátkém čase.

Molekulární metody stále rychleji rozvíjejí a rozšiřují poznatky v oblasti výzkumu rodu *Prunus* a ostatních rostlinných druhů. V dnešní době jsou nezbytnou součástí molekulární genetiky, šlechtění, fingerprintingu a mapování rostlinného genomu.

12. Závěr

Broskvoň (*Prunus persica* (L.)), která je pěstována více než 4000 let, je vysoce oblíbenou a žádanou plodinou. Je využívána jak pro výživu, tak pro okrasné účely. A jelikož je její morfologické sledování v sadech příliš zdlouhavé a náročné, využívají se v dnešní době stále více metoda RFLP a molekulární metody a od nich odvozené molekulární markery SSR, AFLP a RAPD, které jsou získávány na úrovni DNA. Tyto čtyři metody, kromě metody RFLP, pracují na principu PCR. Všechny popisované metody napomáhají zkoumat genetickou variabilitu a strukturu u druhu *Prunus*, jsou využívány ve šlechtění nových kultivarů a podílejí se na urychlení šlechtitelského procesu.

Tyto metody jsou často u broskvoní (*Prunus persica* (L.)) používány pro diagnostiku patogenů a šlechtění na rezistence proti houbovým chorobám: např. *Taphrina deformans*, *Sphaerotheca pannosa*, dále proti bakteriálnímu onemocnění: např. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, proti virovým chorobám: PPV a PLMVd a proti fytoplazmám: ESFYP a AlmWB.

Ke genetické identifikaci a pravosti odrůd se využívá metoda fingerprinting, ke které se též používají metody založené na principu PCR.

Mapování a sekvenování rostlinných genomů napomáhá k objasnění genové funkce. Molekulární markery zde slouží k identifikaci požadovaných genů a k určení jejich vzdálenosti mezi jednotlivými geny na DNA.

Všechny tyto markery při studiu broskvoní slouží pro objasnění genetické variability a jejich využití pro vyšlechtění nových, kvalitnějších a odolnějších kultivarů.

13. Souhrn

Souhrn

Název práce: Srovnání metod RFLP, RAPD, SSR a AFLP použitých při studiu genomu (*Prunus persica* (L.))

Text souhrnu: Broskvoň (*Prunus persica* (L.)), která je pěstována více než 4000 let, je významným hospodářským druhem. Je využívána jak pro výživu, tak pro okrasné účely. Molekulární metody stále rychleji rozvíjejí a rozšiřují poznatky v oblasti výzkumu rodu *Prunus*. Jsou tedy v dnešní době nezbytnou součástí molekulární genetiky, šlechtění, fingerprintingu a mapování rostlinného genomu.

V rámci šlechtění nových odrůd se zlepšuje kvalita broskvoní a zvyšuje se odolnost vůči chorobám a patogenům, čemuž napomáhají metoda RFLP a molekulární markery RAPD, SSR, AFLP, které zkoumají genetickou variabilitu a strukturu u druhu *Prunus*.

Klíčová slova: *Prunus*, molekulární metody, PCR, marker

Summary

The title: The comparison of the RFLP, RAPD, SSR and AFLP methods used during the study of the genome (*Prunus Persica* (L.))

The Resume: The Peachtree (*Prunus persica* (L.)) is a considerable agricultural breed which is planted more than 4.000 years. It has nutritional and garnish utilization. The molecular methods spread out still very fast and they expand the findings about the research of the *Prunus* breed. These methods are the fundamental part of the molecular genetics, the breeding, the fingerprinting and the mapping of the plant genome.

Within the framework of the breeding of the new kinds the molecular markers SSR, RFLP, AFLP and RAPD help to improve the Peachtree quality and to increase the resistance to diseases and pathogens. These molecular markers are used during the research of the genetic variability and of the structure of the *Prunus* breed.

Key words: *Prunus*, the molecular methods, PCR, the marker

14. Použitá literatura

ABBOTT A.; P. ARÚS; R. SCORZA. 2007. Genome mapping and molecular breeding in plants: fruit and nuts Peach.137-156p. In: *Kole Ch* (Ed). Springer, Berlin.

ABOU-JAWDAH, Y.; H. SOBH; M. AKKARY. et al. 2009. First report of Almond witches' broom phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma phoenicium') causing a severe disease on nectarine and peach trees in Lebanon: a potential threat to almond, peach, and nectarine. *EPPO Bulletin*, vol. 39, issue 1, s. 94-98. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2009.02223.x.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2338.2009.02223.x>

ABOU-JAWDAH, Y.; H. DAKHIL; S. EL-MEHTAR. et al. 2003. Almond witches'-broom phytoplasma: a potential threat to almond, peach, and nectarine. *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 25, issue 1, s. 28-32. DOI: 10.1080/07060660309507046.

Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060660309507046>

ALTUBE H. A.; R. S. RIVATA; M. G. ONTIVERO URQUIZA. 1998. Caracterización de portainjertos de duraznero mediante las isoenzimas: peroxidasa, catecol oxidasas y esterasas. *Phyton Int. J. Exp. Bot.*, v. 63, n1/2), p. 81-86, 1998.

AL-SADI, A. M.; I. J. AL-RAISI; M. AL-AZRI. et al. 2012. Population Structure and Management of *Podosphaera pannosa* Associated with Peach Powdery Mildew in Oman. *Journal of Phytopathology* [online]. **160**(11-12): 647-654 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2012.01955.x. ISSN 09311785.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0434.2012.01955.x>

ARANZANA M.; J. CARBÓ; P. ARÚS. 2003. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theor Appl Genet* 106:1341-1352. DOI: 10.1007/s00122-002-1128-5.

Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00122-002-1128-5>

BADENES, M. L.; J. MARTÍNEZ-CALVO; G. LLÁCER. 1998. Analysis of peach germplasm from Spain. *Acta Hort.* (ISHS) 465:243-250
Dostupné z: http://www.actahort.org/books/465/465_30.htm

BAIRD, W. V.; A. S. ESTAGER; S. J. WELLS. 1994. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 199, 1312-1316. ISSN: 2327-9788. Dostupné z: <http://journal.ashspublications.org/content/119/6/1312.short>

BARÁNEK M.; K. MORAVCOVÁ. 2006. *Biotechnologie v zahradnictví: návody pro praktická laboratorní cvičení*. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7937-8.

BARTOLOZZI, F.; M. L. WARBURTON; S. ARULSEKAR. et al. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, [online] [cit. 2015-03-31] Dostupné z: <http://journal.ashspublications.org/content/123/3/381.full.pdf>

BAŽANT Z. 2003. *Pěstujeme broskvoně*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 80-716-9518-1.

BELLINI, E.; E. GIORDANI; R. PERRIA. et al. 2002. Leaf curl in peach: new resistant genotypes and molecular markers. *Acta Hort.* (ISHS) 592:649-653
Dostupné z: http://www.actahort.org/books/592/592_89.htm

BEYERMANN, B.; P. NÜRNBERG; A. WEIHE. et al. 1992. Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **83-83**(6-7): - [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/BF00226686. ISSN 0040-5752.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00226686>

BLAHA, J.; J. LUŽA; J. KALÁŠEK. 1966. *Broskvoně, meruňky, mandloně*. Vydalo nakladatelství Academia Praha, s. 438.

BLENDA, A. V.; I. VERDE; L. L. GEORGI. 2007. Construction of a genetic linkage map and identification of molecular markers in peach rootstocks for response to peach tree short life syndrome. *Tree Genetics* [online]. 2007-8-24, vol. 3, issue 4, s. 341-350 [cit. 2015-04-19]. DOI: 10.1007/s11295-006-0074-9.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11295-006-0074-9>

BOONPRAKOB, U.; D. H. BYRNE; C. J. GRAHAM. et al. 2001. Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers, [online] [cit. 2015-03-31]

Dostupné z: <http://journal.ashspublications.org/content/126/4/451.full.pdf>

BOST S. 1914. Plant Diseases: Bacterial Spot of Peach. *Entomology and Plant Pathology: Agricultural Extension Service, The University of Tennessee* [online]. 1914, s. 2 [cit. 2015-04-18].

Dostupné z: <https://extension.tennessee.edu/publications/Documents/SP277-I.pdf>

BYRNE, D. H. 2002. Peach breeding trends: a world wide perspective. *Acta Hort.* (ISHS) 592:49-59 Dostupné z: http://www.actahort.org/books/592/592_5.htm

BYRNE, D. H. 1990. Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *Journal of Heredity* 81, 68-71. ISSN 1465-7333. Dostupné z: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/81/1/68.short>

CAETANO-ANOLLÉS, G.; P. M. GRESSHOFF, A. WEIHE. et al. 1994. DNA Amplification Fingerprinting Using Arbitrary Mini-hairpin Oligonucleotide Primers. *Bio/Technology* [online]. 12(6): - [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1038/nbt0694-619. ISSN 0733-222x. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt0694-619>

DEBENER, T.; CH. BARTELS; L. MATTIESCH. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Molecular Breeding* [online]. 2(4): 321-327 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/BF00437910. ISSN 1380-3743.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00437910>

DECROOCQ, V.; M. FOULONGNE; P. LAMBERT. et al. 2005. O. Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics* [online]. **272**(6): 680-689 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/s00438-004-1099-0. ISSN 1617-4615.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-004-1099-0>

DIRLEWANGER, E.; V. PRONIER; C. PARVERY. et al. 1998. Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* [online]. **97**(5-6): 888-895 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/s001220050969. ISSN 0040-5752.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s001220050969>

DOYLE, J. J.; L. J. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*). 2008. *African journal of biotechnology* [online]. 2008 [cit. 2015-03-07]. ISSN: 1684-5315. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59260>

ELDREDGE, L. et al. 1992. Application of RFLP analysis to genetic linkage mapping in peaches. *Hort Science*, 27.2: 160-163. ISSN: 2327-9834.

Dostupné z: <http://hortsci.ashspublications.org/content/27/2/160.short>

ERCISLI, S.; G. AGAR; N. YILDIRIM. et al. 2008. Identification of apricot cultivars in Turkey (*Prunus armeniaca* L.) using RAPD markers, *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 14, No. 4, 2009, pp. 4582-4588

FAUST, M.; B. TIMON. 1995. "Origin and dissemination of peach." *Hort. Rev* 17 (1995): 331-379.

FOTIRIC, M.; D. NIKOLIC; V. RAKONJAC. et al. 2007. Variability components and heritability of pomological and chemical characteristics in sour cherry clones of cultivar Montmorency. *Genetika* [online]. **39**(3): 297-304 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.2298/GENSR0703297F. ISSN 0534-0012.

Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0534-00120703297F>

GIOSUÈ, S.; G. SPADA; V. ROSSI. et al. 2000. European Journal of Plant Pathology [online]. **106**(6): 563-571 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1023/A:1008778814623. ISSN 09291873.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1008778814623>

HAHN, W. J.; F. T. GRIFO; V. ROSSI. et al. 1995. Molecular Markers in Plant Conservation Genetics. *The Impact of Plant Molecular Genetics* [online]. Boston, MA: Birkhäuser Boston, **106**(6): 113 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/978-1-4615-9855-8_7. ISBN 978-1-4615-9857-2. ISSN 09291873.

Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-9855-8_7

HARTL, D. L. 1988. *A primer of population genetics*. 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, xi, 305 p. ISBN 08-789-3301-8.

HOSTETTMANN, K. 2014. *Handbook of chemical and biological plant analytical methods*. John Wiley & Sons. ISBN 978-111-9952-756.

HU, D.; Z. ZHANG; Q. ZHANG. et al. 2006. *Ornamental peach and its genetic relationships revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) fingerprints*. Belgie: international society horticultural science, 713 s. ISBN 90-6605-529-4.

CHLOUPEK, O. 2000. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Vyd. 2., upravené a rozšířené. Praha: Academia, 311 p. ISBN 80-200-0779-2.

JELENKOVIC, G.; E. HARRINGTON. 1972. MORPHOLOGY OF THE PACHYTENE CHROMOSOMES IN PRUNUS PERSICA. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* [online]. 14(2): 317-324 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1139/g72-039. ISSN 0008-4093.

Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g72-039>

JI, Q.; J. ZENG; Y. GUO. 2011. Using optimized random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify the category status of *Citrus nobilis* Lour. Gonggan, [online]. [cit. 2015-03-31].

Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/ajb/PDF/pdf2011/19Oct/Qian-hua%20et%20al.pdf>

JOBIN-DECOR, M. P.; G. C. GRAHAM; R. J. HENRY. et al. a R.A. 1972. MORPHOLOGY OF THE PACHYTENE CHROMOSOMES IN PRUNUS PERSICA. *Genetic Resources and Crop Evolution* [online]. 44(5): 471-477 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1023/A:1008644901727. ISSN 09259864.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1008644901727>

KOLLER, B.; A. LEHMANN; J. M. MCDERMOTT. et al. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 85-85(6-7): - [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/BF00225036. ISSN 0040-5752.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00225036>

LEXA, M.; KEJNOVSKÝ. 2015. Rostlinné transpozony a konformace DNA. [online]. [cit.2015-05-01]. Dostupné z: <https://www.muni.cz/fi/research/projects/30883?lang=cs>.

LITT, M.; J. A. LUTY. 1989. 1 "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene." *American journal of human genetics* 44.3 (1989): 397.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715430/>

LUIGI, M.; F. FAGGIOLI. 2011. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology* [online]. 2011, vol. 130, issue 1, s. 109-116 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1007/s10658-010-9738-2.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10658-010-9738-2>

MANUBENS, A.; S. LOBOS; Y. JADUE. et al. 1999. Plant Molecular Biology Reporter. vol. 17, issue 3, s. 255-267. DOI: 10.1023/A:1007656110444.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007656110444>.

MILLER, P. J.; D. E. PARFITT; S. A. WEINBAUM. 1989. Outcrossing in peach. *Hort Science* 24, 359-360. ISSN 0018-5345.

Dostupné z: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=6798228>

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ ČR. 2002. *Metodická příručka pro ochranu rostlin: choroby rostlin*. Brno: Státní rostlinolékařská správa.

MOHAN, M.; S. NAIR; A. BHAGWAT. et al. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Molecular Breeding* [online]. 3(2): 87-103 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1023/A:1009651919792. ISSN 13803743.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1009651919792>

OUKROPEC, I. 2000. *Situace ve šlechtění broskvoní a skořápkatého ovoce*. Sborník referátů: Šlechtění a výzkum okrasných a ovocných rostlin ve XX. Století v ČR a SR, MZLU Brno, s. 142 – 145, ISBN 80 – 7157 – 439 – 2.

OXFORD DICTIONARY OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. 2006. *Revised edition*. Příprava vydání R. Cammack et al. New York: Oxford university press. ISBN 0-19-852917-1.

PALACIO-BIELSA, A.; J. CUBERO; M. A. CAMBRA. et al. 2011. Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Applied and environmental microbiology*, 77(1), 89-97. ISSN: 1098-5336.

Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/77/1/89.short>

POLLINI, C. P.; R. BISSANI; L. GIUNCHEDI. 2001. Occurrence of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFYP) Infection in Peach Orchards in Northern-Central Italy. *Journal of Phytopathology*, vol. 149, 11-12, s. 725-730. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2001.00704.x.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0434.2001.00704.x>

PORUBOVÁ, P.; M. HÁJKOVÁ. 2005. Využití molekulárního fingerprintingu pro identifikaci a odlišení hybridů kukuřice (*zea mays* l.) The using of molecular fingerprinting methods for identification and differentiation of maize hybrids (*zea mays* l.). *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*, 34.

Dostupné z: http://www.vurv.sk/fileadmin/CVRV/subory/Zborniky/Nove_poznatky-1-2005.pdf#page=33

PRAKASH, D. P.; P. NARAYANASRAMY; S. N. SONDUR. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers, *J. Hort. Sci. Biotech.* 77: 287-293. ISSN 1462-0316.

Dostupné z: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=13723959>

RANKOVIC, M.; D. ŠUTIC. 1985. Resistance of some peach cultivars and variable pathogenicity of the sharka (Plum pox) virus. In: *XIII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases 193*. p. 193-200.

Dostupné z: http://www.actahort.org/books/193/193_33.htm

ROSYPAL, S. et al. 2001. *Terminologie molekulární biologie*. První vydání, Brno: vydavatel prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc, ISBN 80-902562-3-6

SALESSES, G.; A. MOURAS. 1977. „Tentative d'utilisation des protoplastes pour l'étude des chromosomes chez les Prunus“. *Annals de l'Amelioration des Plantes* 27, 363-368.

SCORZA, R.; W. B. SHERMAN. 1996. Peaches. In: Janick, J. and Moore, J. N. (eds) *Fruit Breeding*. Vol. I. Tree and Tropical Fruit. Wiley, New York, pp. 325-440.

TESTOLIN, R.; T. MARRAZZO; G. CIPRIANI. et al. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* [online]. Chichester, UK: John Wiley, **43**(3): 512-520 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1139/gen-43-3-512. ISBN 9781405169240. ISSN 1480-3321. Dostupné z: http://www.nrc.ca/cgi-bin/cisti/journals/rp/rp2_abst_e?gen_g00-010_43_ns_nf_gen43-00.

THAIPONG, K.; K. KRISANAPOOK; U. BOONPRAKOB. 2003. Evaluation of genetic relationships of persimmons in Thailand based on RAPD markers, [online] 2015. [cit. 2015-03-31]
Dostupné z: http://pirun.ku.ac.th/~agrkst/RAPD_persimmon.pdf

ULANOVSKY, S.; Y. GOGORCENA; F. MARTÍNEZ DE TODA. et al. 2002. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* [online]. Chichester, UK: John Wiley, **92**(3-4): 241-254 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/S0304-4238(01)00291-6. ISBN 9781405169240. ISSN 03044238.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423801002916>

VOS, P.; R. HOGERS; M. BLEEKER. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* [online]. Chichester, UK: John Wiley, **23**(21): 4407-4414 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1093/nar/23.21.4407. ISBN 9781405169240. ISSN 0305-1048.

Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/23.21.4407>

WARBURTON, M.; L. BLISS; A. FREDRICK. 1996. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121.6: 1012-1019. ISSN: 2327-9788.

Dostupné z: <http://journal.ashspublications.org/content/121/6/1012.short>

WEISING, K., et al. 2005. *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press, 444 p. ISBN 08-493-1488-7.

WELSH, J.; M. MCCLELLAND; M. BLEEKER. et al. 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers: a new technique for DNA fingerprinting*. *Nucleic Acids Research* [online]. Chichester, UK: John Wiley, **18**(24): 4407-4414 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1093/nar/18.24.7213. ISBN 9781405169240. ISSN 0305-1048.

Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/23.21.4407>

XU, D. H.; S. WAHYUNI; Y. SATO. et al. 2006. *Genetic Diversity and Relationships of Japanese Peach (*Prunus persica* L.) Cultivars Revealed by AFLP and Pedigree Tracing: a new technique for DNA fingerprinting*. *Genetic Resources and Crop Evolution* [online]. Chichester, UK: John Wiley, **53**(5): 883-889 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1007/s10722-004-0575-z. ISBN 9781405169240. ISSN 0925-9864.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10722-004-0575-z>

YANG, N., G. REIGHARD, K. GASIC, et al. 2013. *Development of a Genetic Linkage Map for Identification of Molecular Markers Associated with Resistance to Bacterial Spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in Peach*. *Belgie: INT SOC HORTICULTURAL SCIENCE*, 976 s. ISBN 978-90-66051-19-5.

YUZHU, W. 2000. Sdělení přes Internet, Univerzita Peking, Čína.

ZABEAU, M.; P. VOS. 1993. *Selective restriction fragment amplification a general method for DNA fingerprinting*, European Patent Application EP 0534858.